

01P21603

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 100 15 156 A 1

51 Int. Cl. 7:
G 01 N 33/48
G 01 N 1/04
G 01 N 1/28

21 Aktenzeichen: 100 15 156.6
22 Anmeldetag: 27. 3. 2000
43 Offenlegungstag: 18. 10. 2001

DE 100 15 156 A 1

71 Anmelder:
P.A.L.M. GmbH, 82347 Bernried, DE

74 Vertreter:
Patent- und Rechtsanwälte Kraus & Weisert, 80539
München

72 Erfinder:
Schütze, Karin, Dr., 82515 Wolfratshausen, DE

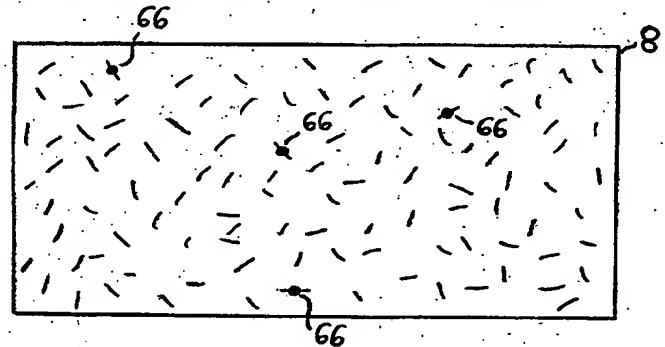
55 Entgegenhaltungen:
WO 97 29 355 A1
WO 97 29 354 A1
WO 97 11 156 A2
Cell. mol. Biol. 44 (1998) S.735-746;
Bioforum ZZ (1999) S.702-705;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren und Vorrichtung zur Gewinnung eines biologischen Objekts aus einer biologischen Masse

57 Zur einfachen Gewinnung eines biologischen Objekts, beispielsweise einer Zelle, aus einer biologischen Masse, beispielsweise einem Zellgewebe, wird vorgeschlagen, durch eine geeignete Laserbestrahlung in Form eines Laserschusses das gewünschte biologische Objekt (64) direkt auf der umgebenden biologischen Masse, die sich auf einem Träger (3) befindet, zu einer Auffangvorrichtung (2) herauszukatapultieren. Ein separater Schneidvorgang zum Herauslösen des biologischen Objekts (64) aus der umgebenden biologischen Masse ist nicht erforderlich. Die Erfindung eignet sich insbesondere für eine rechnergestützte Realisierung, bei der herauszukatapultierende biologische Objekte (64) ausgewählt und markiert und anschließend automatisch die entsprechenden Positionen dieser biologischen Objekte (64) mit dem Laserstrahl angefahren und in Form eines Laserschusses bestrahlt werden, um die ausgewählten biologischen Objekte (64) nacheinander von dem Träger (3) zu der Auffangvorrichtung (2) zu katapultieren.



DE 100 15 156 A 1

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung eines biologischen Objekts aus einer biologischen Masse nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1 sowie eine entsprechende Vorrichtung nach dem Oberbegriff des Anspruchs 11.

[0002] Zur Materialinjektion in lebende Zellen ist die Verwendung von sogenannten Mikrokapillaren bekannt, die über einen meist pneumatisch oder hydraulisch bewegten Mikromanipulator gesteuert werden. Die gewünschten Substanzen werden unter großer mechanischer Belastung in die einzelne Zelle injiziert. Die Herstellung der sterilen Mikrokapillaren ist zeitaufwendig und kostenintensiv.

[0003] Aus diesem Grund wurde die Verwendung eines fokussierten Laserstrahls vorgeschlagen, um kleine selbstheilende Löcher ohne mechanischen Kontakt in die Zellmembran zu bohren. Die kurze Öffnungszeit reicht aus, um das in der umgebenden Flüssigkeit gelöste Material in die Zelle einzuschleusen. Ein mit dieser Methode verbundenes Problem besteht jedoch darin, dass für eine präzise Laser-Mikroinjektion die Zielobjekte sowohl lateral, d. h. in x- und y-Richtung, als auch vertikal, d. h. in z-Richtung, mit Nanometer-Genauigkeit angefahren werden müssen. Ein weiteres Problem besteht darin, die erfolgreich injizierten Zellen von den anderen Zellen zu isolieren bzw. für die weiteren Untersuchungen zu präparieren.

[0004] Zur Separierung einzelner Zellen aus einer großen Zahl von in einer Flüssigkeit dispergierten biologischen Objekten sind geeignete Trenn- bzw. Sortiervorrichtungen kommerziell erhältlich. Während bei der fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung ("Fluorescence Activated Cell Sorter", FACS) elektrostatische Prinzipien zur räumlichen Separation zum Einsatz kommen, wird bei der magnetisch aktivierten Zellsortierung ("Magnetic Activated Cell Sorter", MACS) mit magnetischen Kräften gearbeitet. Hierbei liegen die Zellen jedoch nicht auf einem planaren Träger nebeneinander. Überdies haben beide Methoden den Nachteil, dass sich manche Objekte nur eingeschränkt (FACS) oder überhaupt nicht getrennt voneinander absondern lassen (MACS).

[0005] Die zuvor beschriebenen Methoden können keine einzelnen Zellen aus einem Zellverband, wie etwa einem Gewebe oder einem histologischen Gewebepreparat, lösen.

[0006] In der WO 97/29355 A der Anmelderin wurde daher ein neuartiges Verfahren zum Sortieren und zur Gewinnung von einzelnen biologischen Objekten, die auf einem planaren Träger angeordnet sind, vorgeschlagen. Dabei wird vorgeschlagen, ein selektiertes biologisches Objekt von der umgebenden weiteren biologischen Masse durch einen Laserstrahl abzutrennen, so dass das selektierte biologische Objekt von der weiteren biologischen Masse frei präpariert ist. Das somit frei präparierte biologische Objekt wird anschließend mit Hilfe eines Laserschusses von dem Träger zu einer Auffangvorrichtung katapultiert, wobei es sich bei der Auffangvorrichtung beispielsweise um ein Auffangsubstrat handeln kann. Als Träger der biologischen Masse kann eine das Laserlicht absorbierende Polymerfolie verwendet werden.

[0007] Ein zu separierendes biologisches Objekt einer auf dem Träger aufgetragenen biologischen Masse wird somit zunächst selektiert, aus der biologischen Masse ausgeschnitten und anschließend durch einen laserinduzierten Transportprozess zu der Auffangvorrichtung geschleudert. Unter "biologischen Objekten" werden dabei im Rahmen der vorliegenden Anmeldung vor allem lebende oder fixierte biologische Zellen oder Zellbestandteile verstanden, die Bestandteil eines flüssigen oder festen biologischen Materials, wie

beispielsweise eines Zellgewebes, sind.

[0008] Mit Hilfe des zuvor beschriebenen Verfahrens, welches dem Oberbegriff des Anspruchs 1 zugrundeliegt, können bestimmte biologische Objekte gezielt mit einer ausgewählten Substanz durch berührungslose Laser-Mikroinjektion beladen und anschließend die erfolgreich injizierten biologischen Objekte aussortiert werden. Die biologischen Objekte können nebeneinander auf einem festen planaren Träger aufgebracht sein, wobei der Vorgang des Absonderns innerhalb kürzer Zeit und berührungslos durchgeführt werden kann. Die Überlebensfähigkeit bzw. die Morphologie der biologischen Objekte wird gewährleistet, d. h. die biologischen Objekte werden durch den Mikroinjektionsvorgang und durch den Abtrennprozess nicht geschädigt bzw. beeinträchtigt.

[0009] Das zuvor beschriebene Verfahren kann jedoch manuell nur relativ aufwendig mit der gewollten Präzision durchgeführt werden, da ein abzutrennendes biologisches Objekt nach dem Schneidevorgang präzise gegenüber dem Laser positioniert bzw. ausgerichtet werden muss, um anschließend durch einen weiteren Laserimpuls bzw. Laserschuss zu der Auffangvorrichtung katapultiert werden zu können. D. h. nach dem Schneidevorgang muss der Mittelpunkt des gewünschten biologischen Objekts möglichst exakt angefahren werden. Zudem ist bei einer manuellen Durchführung dieses Verfahrens eine mehrmalige Wiederholung ein und desselben Schneidevorgangs/Katapultiervorgangs nicht mit hoher Genauigkeit möglich.

[0010] Bei der aus der zuvor beschriebenen Druckschrift bekannten Vorgehensweise ist zudem nachteilig, dass zum Separieren und Sammeln einzelner biologischer Objekte eines biologischen Materials diese zunächst mit einer ersten Laserbestrahlung aus dem jeweiligen biologischen Material ausgeschnitten und anschließend in einem zweiten Arbeitsschritt durch einen weiteren Laserschuss von dem Träger in die Auffangvorrichtung katapultiert werden müssen. Da zum Sammeln der einzelnen biologischen Objekte zwei separate Arbeitsschritte erforderlich sind, ist diese Vorgehensweise sowohl bei einer manuellen als auch bei einer automatisierten Durchführung des Verfahrens zeitaufwendig. Zudem ist der Steueraufwand bei der automatisierten Durchführung des Verfahrens relativ hoch.

[0011] Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren sowie eine entsprechende Vorrichtung zur Gewinnung eines biologischen Objekts aus einer biologischen Masse vorzuschlagen, wobei das biologische Objekt einfacher und schneller aus der biologischen Masse gewonnen werden kann.

[0012] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 bzw. eine Vorrichtung mit den Merkmalen des Anspruchs 11 gelöst. Die Unteransprüche definieren jeweils bevorzugte und vorteilhafte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung.

[0013] Bei umfangreichen Untersuchungen hat sich herausgestellt, dass aus einer biologischen Masse, wie beispielsweise einem Zellgewebe oder einer Flüssigkeit, ein bestimmtes biologisches Objekt, wie beispielsweise eine lebende Zelle, auch ohne vorheriges Ausschneiden mit Hilfe einer Laserbestrahlung direkt aus der biologischen Masse herauskatapultiert werden kann, wenn die Bestrahlungsenergie und/oder die Fokussierung des Laserstrahls entsprechend eingestellt wird. D. h. ein biologisches Objekt einer biologischen Masse kann durch eine einzige Laserbestrahlung sowohl aus der auf einem Träger befindlichen biologischen Masse herausgelöst und von dem Träger zu einer entsprechenden Auffangvorrichtung katapultiert werden.

[0014] Die Laserbestrahlung, mit der das gewünschte biologische Objekt herauskatapultiert wird, erfolgt vorzugs-

weise in Form eines Laserschusses, der lediglich ein oder zwei Laserimpulse umfasst.

[0015] Es empfiehlt sich, für das Katapultieren die Laserenergie im Vergleich zu einem mit demselben Laser durchgeführten Schneidevorgang der entsprechenden biologischen Masse um ca. 10–25%, vorzugsweise um 15–25%, zu erhöhen. Ebenso empfiehlt es sich, den Laserstrahl im Vergleich zu einem Schneidevorgang gegenüber der Objektebene, auf der die zu bearbeitende biologische Masse angeordnet ist, zu defokussieren, wobei insbesondere die Defokussierung prozentual ähnlich zur Erhöhung der Bestrahlungsenergie gewählt werden kann. Besonders vorteilhaft hat sich eine Verstellung des Brennpunktes des Laserstrahls um ca. 1–2 µm in Bezug auf die Objektebene erwiesen.

[0016] Da mit Hilfe der vorliegenden Erfindung der separate Schritt des Ausschneidens des zu katapultierenden biologischen Objekts aus der umgebenden biologischen Masse wegfällt, ist die erfindungsgemäße Vorgehensweise deutlich zeitsparender und ermöglicht insbesondere eine Automatisierung mit geringem Steueraufwand. Das erfindungsgemäße Verfahren kann somit besonders vorteilhaft rechnergestützt durchgeführt werden, wobei ein oder mehrere biologische Objekte rechnergestützt ausgewählt, deren entsprechenden Positionen innerhalb der umgebenden biologischen Masse gespeichert und anschließend rechnergestützt angefahren und mit einem Laserschuss bestrahlt werden, um die einzelnen ausgewählten biologischen Objekte von dem Träger zu der Auffangvorrichtung zu katapultieren.

[0017] Die vorliegende Erfindung eignet sich beispielsweise dazu, bestimmte Substanzen in einzelnen biologischen Objekten, beispielsweise Zellen, zu mikroinjizieren und anschließend diese durch Herauskatapultieren auszusortieren. Des weiteren können mit Hilfe der vorliegenden Erfindung sehr einfach einzelne Objekte aus einer sehr großen Zahl von biologischen Objekten (z. B. in der Größenordnung 10^5 – 10^6) räumlich abgetrennt (d. h. separiert) und gleichzeitig ausgesondert werden. Die Abtrennung von gehäuft Zellen als Gesamteinheit ist ebenso möglich. Unter "biologischen Objekten" werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung vor allem lebende oder fixierte biologische Zellen oder Zellbestandteile verstanden, welche sich in einem festen oder flüssigen biologischen Material, beispielsweise einem Zellgewebe, befinden, das auf einem vorzugsweise planaren Träger aufgebracht ist.

[0018] Zum Katapultieren der biologischen Objekte eignet sich beispielsweise ein gepulster UV-Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm. Als Träger kann eine aus einer UV-absorbierenden Polymerfolie bestehende Trägerfolie verwendet werden, deren Absorptionsverhalten an die Wellenlänge des Lasers angepasst ist, also zumindest in der Umgebung der Laserwellenlänge ein Absorptionsmaximum besitzt. Als Auffangvorrichtung kann eine Folie oder Platte verwendet werden, die abhängig von der Richtung der Laserbestrahlung ober- oder unterhalb von dem Träger, vorzugsweise parallel dazu, angebracht ist. Diese Platte oder Folie wird vorzugsweise mit einer adhäsiven Schicht versehen. Durch eine feuchte Klebeschicht können die herauskatapultierten Objekte auf der entsprechenden Platte oder Folie fixiert werden. Die Auffangvorrichtung kann aber auch in Form eines topfförmigen Behälters ausgebildet sein. Diesbezüglich kommt insbesondere die Verwendung von sogenannten Mikrozentrifugenbehältern, beispielsweise einer Mikrotiterplatte mit 90 bis 500 Vertiefungen ("wells"), infrage, wie sie in der Molekularbiologie verwendet werden. Bei Verwendung einer derartigen Mikrotiterplatte können mehrere nacheinander herauskatapultierte biologische Objekte in separaten Vertiefungen aufgefangen werden. Selbstverständlich ist jedoch auch möglich, mehrere biologische

Objekte in ein und derselben Vertiefung einer derartigen Mikrotiterplatte zu sammeln.

[0019] Die Erfindung wird nachfolgend unter Bezugnahme auf die beigelegte Zeichnung anhand bevorzugter Ausführungsbeispiele näher erläutert.

[0020] Fig. 1 zeigt den prinzipiellen Aufbau einer Vorrichtung zur Realisierung der vorliegenden Erfindung,

[0021] Fig. 2 zeigt ein Bedienpaneel eines in Fig. 1 gezeigten Lasers,

[0022] Fig. 3 zeigt ein auf einem in Fig. 1 gezeigten Bildschirm dargestelltes Menüfenster, mit dem ein Menüfenster zur automatischen Steuerung eines Trägartisches, ein Menüfenster zur automatischen Steuerung von Schneide- und/oder Katapultvorgängen und ein Menüfenster zur automatischen Steuerung einer in Fig. 1 gezeigten Auffangvorrichtung aufgerufen werden können,

[0023] Fig. 4 zeigt das Menüfenster zur automatischen Steuerung des Trägartisches,

[0024] Fig. 5 zeigt das Menüfenster zur automatischen Steuerung von Schneide- und/oder Kalibriervorgängen,

[0025] Fig. 6 zeigt das Menüfenster zur automatischen Verstellung der Auffangvorrichtung,

[0026] Fig. 7 zeigt ein Menüfenster zur Einstellung einer Lasermarkierung, die auf dem in Fig. 1 gezeigten Bildschirm dargestellt wird,

[0027] Fig. 8A–Fig. 8C zeigen Darstellungen zur Verdeutlichung eines rechnergestützten Schneidevorgangs bei dem in Fig. 1 gezeigten System,

[0028] Fig. 9A und Fig. 9B zeigen Darstellungen zur Verdeutlichung eines rechnergestützten Katapultvorgangs bei dem in Fig. 1 gezeigten System für ein zuvor gemäß Fig. 8A–8C geschnittenes biologisches Objekt, und

[0029] Fig. 10A und Fig. 10B zeigen Darstellungen zur Verdeutlichung des rechnergestützten direkten Katapultierens mehrerer biologischer Objekte, ohne dass diese zuvor mittels Laserbestrahlung aus der umgebenden biologischen Masse herausgeschnitten worden sind.

[0030] In Fig. 1 ist der Aufbau eines Laser-Mikroskop-Systems dargestellt, wie es zur Realisierung der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden kann. Das System ist modular aufgebaut und kann somit an unterschiedliche experimentelle Anforderungen individuell angepasst werden.

[0031] Wesentlicher Bestandteil des in Fig. 1 gezeigten Systems ist eine Laservorrichtung 4, in der eine Laserlichtquelle zur Erzeugung eines Laserstrahls untergebracht ist. Des weiteren ist in der Laservorrichtung 4 die Optik 5, 6 untergebracht, die erforderlich ist, um den Laserstrahl in ein Mikroskop 1 einzukoppeln und den Laserfokus in der Objektebene auf den optischen Fokus des Mikroskops 1 abzustimmen. Im vorliegenden Fall handelt es sich um einen gepulsten UV-Stickstofflaser, dessen Wellenlänge 337 nm und dessen Impulsenergie mindestens 270 µJ beträgt. Die Impulsdauer beträgt 3 ms, während die Impulsfrequenz 1–30 Impulse pro Sekunde beträgt.

[0032] Zur Steuerung der Laservorrichtung 4 ist das in Fig. 2 gezeigte Steuerpaneel vorgesehen. Der Stickstofflaser emittiert einen Laserstrahl mit einer festen Laserenergie. Für eine präzise Laser-Mikromanipulation ist jedoch eine präzise Verstellung der Laserenergie erforderlich. Aus diesem Grund ist ein Quarzfilter 5 senkrecht zum Laserstrahlpfad angeordnet. Dieser Quarzfilter wird von einem Gleichstrommotor gedreht, der über einen am Steuerpaneel befindlichen Potentiometerknopf 12 gesteuert werden kann, um somit die Laserenergie entsprechend einzustellen. Die augenblicklich eingestellte Laserenergie wird in einer LCD-Anzeige 17 dargestellt. Zudem ist an der Seite der Laservorrichtung 4 ein Verstellknopf zur manuellen Verstellung des Quarzfilters 5 vorgesehen, wobei jedoch für diese manuelle Verstellung

keine LCD-Anzeige vorgesehen ist.

[0033] Neben der Einstellung der Laserenergie kann auch der Laserfokus unabhängig von dem Mikroskopfokus eingestellt werden, d. h. der Brennpunkt des Lasers kann in z-Richtung relativ zur Objektebene des Mikroskops 1 verschoben werden. Zu diesem Zweck ist ebenfalls ein Schrittmotor vorgesehen, der die in Fig. 1 gezeigten Linsen 6 bewegt. Die Fokussierung bzw. der Schrittmotor kann durch einen weiteren, in Fig. 2 gezeigten Potentiometerknopf 11 gesteuert werden, wobei die augenblickliche Einstellung des Laserfokus in einer weiteren LCD-Anzeige 16 dargestellt wird. Auch die Linsen 6 können über einen an der Seite der Laservorrichtung 4 vorgesehenen Einstellknopf manuell verstellt werden, wobei für diese manuelle Einstellung analog zum Fall der Einstellung der Laserenergie keine LCD-Anzeige vorhanden ist.

[0034] Über einen Schalter 13 des Steuerpaneels kann zwischen einem automatischen Betrieb und einem manuellen Betrieb der Laservorrichtung 4 umgeschaltet werden. Des weiteren ist ein Potentiometerknopf 14 zur Einstellung der Impulsrate des Lasers (1–30 Impulse pro Sekunde) vorgesehen. Eine Anzeige 15 informiert darüber, ob die Laservorrichtung 4 augenblicklich eingeschaltet ist.

[0035] Der Laserstrahl wird über mehrere beschichtete Strahlteiler in das Mikroskop 1 eingekoppelt und zu einem Objektiv 18 hin abgelenkt. Der Durchmesser des auf der Objektebene auftreffenden Laserstrahls ist maßgeblich von der numerischen Apparatur des Objektivs 18 abhängig. Ein Objektiv mit einer relativ hohen numerischen Apparatur ermöglicht Laserstrahldurchmesser kleiner als 1 µm. Zudem sollte darauf geachtet werden, dass das jeweils verwendete Objektiv 18 eine hohe Durchlässigkeit für die jeweilige Laserwellenlänge aufweist, um Energieverluste zu minimieren.

[0036] Der über das Objektiv 18 emittierte Laserstrahl trifft schließlich auf einen motorisierten und computergesteuerten Mikroskop- oder Trägartisch 3, auf dem ein Träger mit einer zu bearbeitenden biologischen Masse angeordnet ist. Oberhalb des Trägartisches 3 befindet sich ein ebenfalls motorisierter und computergesteuerter Manipulator 2. Die Komponenten 2 und 3 ermöglichen eine exakte Objektpositionierung mit Nanometer-Präzision sowie die automatische Durchführung von Mikro-Manipulationsprozeduren.

[0037] Der motorisierte Trägartisch 3 ist entlang zweier linearer Achsen (x- und y-Richtung) verfahrbar. Zu diesem Zweck sind zwei Hybrid-Schrittmotoren mit vier Schritten pro 360°/Umdrehung vorgesehen. Die minimale Schrittgröße beträgt 20 nm, so dass der auf dem Trägartisch 3 befindliche Träger mit sehr hoher Genauigkeit positioniert werden kann.

[0038] An dem motorisierten Manipulator 2 kann beispielsweise eine Nadel oder Mikropipette zur Mikroinjektion angebracht sein. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird jedoch davon ausgegangen, dass an dem Manipulator 2 eine Auffangvorrichtung angebracht ist, um von dem Träger wegkatapultierte biologische Objekte aufzufangen. Der motorisierte Manipulator 2 kann sowohl in x- und y-Richtung als auch in z-Richtung verfahren werden. Zu diesem Zweck sind drei Schrittmotoren vorgesehen, welche dieselbe Präzision wie die für den Trägartisch 3 vorgesehenen Schrittmotoren aufweisen.

[0039] Vorzugsweise ist sowohl der Trägartisch 3 als auch der Manipulator 2 mit Endschaltern ausgestattet, die gewährleisten, dass der jeweilige Antriebsmotor automatisch gestoppt wird, falls eine Achse bis zu dem entsprechenden Endschalter verfahren wird.

[0040] Auch die Einstellung des Laserfokus kann begrenzt werden, um Schäden am Objektiv 18 zu vermeiden.

[0041] Bei dem Mikroskop 1 kann es sich um ein beliebig ausgestattetes Mikroskop handeln. Insbesondere ist sowohl die Verwendung eines inversen als auch eines aufrechten Mikroskops oder eines Lasermikroskops denkbar. Das Mikroskop 1 ist mit einer Videokamera, insbesondere einer CCD-Videokamera ("Charge Coupled Device") ausgestattet, die den Bereich des Trägers 3 oberhalb des Objektivs 18 aufnimmt. Das Videosignal dieser Videokamera wird einem handelsüblichen Computer ("Personal Computer") 7 zugeführt und dort mit einer Framegrapper-Karte verarbeitet, so dass das entsprechende Videobild in Echtzeit auf dem Bildschirm oder dem Monitor 8 des Computers 7 dargestellt werden kann. Ebenso ist ein Speichern einzelner Videobilder auf einem geeigneten Speichermedium des Computers 7 möglich. Des weiteren kann mit dem Computer 7 auch ein analoger oder digitaler Videorekorder zum Aufzeichnen der von der Videokamera gelieferten Videobilder gekoppelt sein. Wie nachfolgend noch näher beschrieben wird, sind auf dem Computer 7 bzw. der darauf ablaufenden Software verschiedene Funktionen implementiert, die sowohl eine rechnergestützte, d. h. automatische, Ansteuerung der Laservorrichtung 4 als auch des Mikroskops 1 ermöglichen, so dass beispielsweise der Laser automatisch aktiviert und der Manipulator 2 bzw. der Trägartisch 3 automatisch verfahren werden können. Zur Einstellung bzw. Auswahl dieser Funktionen sind herkömmliche Eingabemittel, wie beispielsweise eine Tastatur 9 oder eine Computermouse 10, vorgesehen. Des weiteren ist der Laservorrichtung 4 ein Fußschalter 67 zugeordnet, durch dessen Betätigung der Laser manuell aktiviert werden kann.

[0042] Nachfolgend sollen die bei dem in Fig. 1 gezeigten System zur Steuerung des Mikroskops 1 bzw. des Trägartisches 3 und des Manipulators 2 sowie des Lasers 4 vorgesehenen Funktionen näher erläutert werden.

[0043] Nach dem Einschalten des Computers 7 wird auf dem Bildschirm 8 das von der Videokamera augenblicklich aufgenommene Mikroskopbild mit einer Markierung für den Laser-Zielpunkt dargestellt. Am unteren Bildschirmrand erscheint ein Statusfenster, während am oberen Bildschirmrand ein in Fig. 3 näher dargestelltes Menüfenster 19 zum Aufrufen weiterer Menüfenster geöffnet wird. Das Steuerprogramm wird im wesentlichen über die in Fig. 1 gezeigte Computermouse 10, vorzugsweise eine Drei-Tasten-Mouse gesteuert, wobei jedoch auch einige Funktionen durch entsprechende Tastenkombinationen der Tastatur 9 aufgerufen werden können.

[0044] Im wesentlichen kann zwischen zwei unterschiedlichen Betriebsmodi unterschieden werden. Im sogenannten Cursor-Modus können mit Hilfe der Mouse Menüs geöffnet, entsprechende Menüfunktionen ausgewählt und sogenannte Buttons angeklickt werden. Im Verfahr-Modus werden hingegen Bewegungen der Mouse 10 direkt in entsprechende Verstellsignale und somit entsprechende mechanische Bewegungen des Trägartisches 3 oder des Manipulators 2 umgesetzt. Im Cursor-Modus können der Manipulator 2 oder der Trägartisch 3 nicht durch Hin- und Herbewegen der Mouse 10 bewegt werden. Durch Betätigen beispielsweise der mittleren Maustaste kann zwischen dem Cursor- und dem Verfahr-Modus hin- und hergeschaltet werden. Der Verfahr-Modus besitzt verschiedene Varianten, zwischen denen durch Betätigen beispielsweise der rechten Maustaste hin- und hergeschaltet werden kann. So kann in einer ersten Variante des Verfahr-Modus durch Bewegen der Mouse 10 der Trägartisch 3 in xy-Richtung verschoben werden. D. h. durch Verschieben der Mouse 10 nach oben wird entsprechend der Trägartisch 3 in dieselbe Richtung verschoben, was auf dem Bildschirm 8 anhand des jeweils in Echtzeit aktualisierten Videobilds nachvollzogen werden kann. Diese

Zuordnung kann jedoch auch umgekehrt werden, um beispielsweise beim Betrachten der Probe eine Übereinstimmung zwischen der Verschiebung des sichtbaren Videobilds und der Mausebewegung herbeizuführen. In einer zweiten Variante des Verfahr-Modus wird der Manipulator 2 entsprechend der Mausebewegung in xy-Richtung verschoben, wobei hinsichtlich der Ansteuerung des Manipulators 2 die vorhergehenden Bemerkungen analog Gültigkeit besitzen. In einer dritten Variante des Verfahr-Modus kann der Manipulator 2 entsprechend der Mausebewegung in z-Richtung verschoben werden, so dass der Abstand zwischen dem Trägartisch 3 und dem Manipulator 2 entsprechend verändert wird. Vorzugsweise ist immer ein XY-Verfahr-Modus, d. h. entweder der Trägartisch-XY-Modus oder der Manipulator-XY-Modus, vorgewählt. Solange der Verfahr-Modus im Hintergrund zwar gewählt, jedoch noch nicht aktiviert ist, befindet sich die Steuerung im Cursor-Modus.

[0045] Das Statusfenster ist immer am unteren Bildschirmrand sichtbar und kann (im Cursor-Modus) angeklickt und mit der Maus 10 verschoben werden. Im Statusfenster wird unter anderem angezeigt, ob sich die Steuerung augenblicklich im Cursor-Modus oder im Verfahr-Modus befindet. Befindet sich die Steuerung im Verfahr-Modus, wird zudem die augenblicklich aktivierte Variante des Verfahr-Modus (Trägartisch-XY-Modus, Manipulator-XY-Modus oder Manipulator-Z-Modus) angezeigt. Des weiteren wird im Statusfenster die Anzahl der für den Trägartisch 3 augenblicklich gespeicherten Positionswerte sowie der augenblicklich ausgewählte Trägartisch-Positionswert angezeigt. Des weiteren wird im Statusfenster angezeigt, welcher von drei möglichen Geschwindigkeitsbereichen für die Verstellung des Trägartisches 3 augenblicklich ausgewählt ist. Eine weitere Anzeige des Statusfensters gibt den in der Steuerung augenblicklich ablaufenden aktiven Steuerbefehl wieder. Zudem werden im Statusfenster die X- und Y-Koordinaten angezeigt, welche die absolute Position (in μm) des Mikroskop- bzw. Trägartisches, bezogen auf die beim Programmstart vorgefundene Null-Position, definieren. Schließlich ist in dem Statusfenster auch der Radius (in μm) eines mit einer nachfolgend noch näher beschriebenen Funktion gezeichneten Kreises zum automatischen Ausschneiden eines auf dem Träger befindlichen biologischen Objekts dargestellt.

[0046] Nachfolgend sollen die im Cursor-Modus zur Verfügung stehenden Steuerfunktionen näher erläutert werden.

[0047] Wie bereits zuvor erwähnt worden ist, wird in der Regel nach dem Einschalten des Computers 7 auf dem Bildschirm 8 das in Fig. 3 gezeigte Menüfenster 19 dargestellt, welches drei sogenannte Buttons 20-22 aufweist. Durch Anklicken dieser Buttons 20-22 mit der Maus kann jeweils ein weiteres, dem angeklickten Button zugewiesenes Menüfenster aufgerufen und auf dem Bildschirm 8 geöffnet werden. Durch Anklicken des Buttons 20 kann ein in Fig. 4 gezeigtes Menüfenster geöffnet werden, welches die wesentlichen zur Steuerung des Trägartisches 3 vorgesehenen Steuerfunktionen beinhaltet. Durch Anklicken des Buttons 21 kann ein in Fig. 5 näher dargestelltes Menüfenster geöffnet werden, welches automatische Schneide- und/oder Katapultierfunktionen beinhaltet. Durch Anklicken des Buttons 22 kann schließlich ein in Fig. 6 dargestelltes Menüfenster geöffnet werden, welches Steuerfunktionen für den in Fig. 1 gezeigten Manipulator 2 aufweist.

[0048] Nachfolgend sollen die einzelnen Funktionen des in Fig. 4 gezeigten Menüfensters 23 näher erläutert werden.

[0049] Wie bereits zuvor erwähnt worden ist, kann der Trägartisch im Verfahr-Modus durch eine einfache Mausebewegung beliebig verfahren bzw. verstellt werden. Befindet sich der Trägartisch 3 in einer gewünschten Position, kann

wieder in den Cursor-Modus gewechselt und mit der Maus der in Fig. 4 gezeigte Button 24 angeklickt werden, so daß die aktuelle Position des Trägartisches 3 gespeichert wird. Gleichzeitig wird der bereits zuvor erwähnte Positionszähler im Statusfenster um 1 erhöht. Diese Schritte können beliebig wiederholt werden, wenn weitere neue Positionswerte abgespeichert werden sollen. Um einzelne Positionswerte leichter wiederauffinden zu können, kann beim Speichern jeder einzelne Positionswert mit einem positionsspezifischen Kommentar versehen werden. Zu diesem Zweck ist der Button 25 vorgesehen, bei dessen Anklicken mit der Maus 10 ein Kommentar-Fenster geöffnet wird, in welches ein der jeweiligen Position entsprechender Kommentar eingegeben und abgespeichert werden kann. Durch Anklicken des Buttons 26 wird ein Auswahlfenster für die gespeicherten Positionswerte geöffnet, so dass der Benutzer mit der Maus einen gewünschten Punkt bzw. eine gewünschte Position auswählen kann, die anschließend durch Erzeugung entsprechender Verstellsignale für die den Trägartisch 3 verstellenden Motoren angefahren wird. Gleichzeitig wird im Statusfenster der angefahrte Positionswert mit seiner fortlaufenden Nummer und dem gespeicherten Kommentar angezeigt.

[0050] Durch die in Fig. 4 gezeigten Buttons 27 und 28 des Menüfensters 23 können die gespeicherten Positionswerte nacheinander aufgerufen und angefahren werden. Mit jedem Anklicken des Buttons 27 wird der jeweils nächste Positionswert aus der Liste angefahren, während durch Anklicken des Buttons 28 der jeweils vorhergehende Positionswert in der Liste angefahren wird. Mit Hilfe der beiden Buttons 29 und 30 können gespeicherte Positionswerte gelöscht werden, wobei durch Anklicken des Buttons 29 lediglich der augenblickliche Positionswert in der Liste gelöscht wird, während durch Anklicken des Buttons 30 sämtliche in der Liste enthaltenen Positionswerte gelöscht werden.

[0051] Durch Anklicken des Buttons 31 kann ein Fenster aufgerufen werden, in dem für das Anfahren gespeicherter Positionswerte eine Geschwindigkeit festgelegt wird. Auch der in Fig. 4 gezeigte Bereich 34 dient zur Einstellung der Geschwindigkeit, wobei durch Auswählen einer der drei dargestellten Geschwindigkeitsstufen für den Verfahr-Modus die Geschwindigkeit für die Umsetzung der Mausebewegung in eine entsprechende Trägartischbewegung ausgewählt werden kann. Der darunter befindliche Einstellbereich 35 erlaubt diesbezüglich eine Geschwindigkeit-Feineinstellung für die Umsetzung der Mausebewegung im Verfahr-Modus.

[0052] Durch Anklicken des Buttons 32 kann ein vorgegebener Bereich des auf dem Träger befindlichen biologischen Materials mäanderförmig abgefahren werden. Nach Anklicken des Buttons 32 wird hierzu ein Fenster geöffnet, in dem die Breite des abzufahrenden Bereichs in x-Richtung und die Tiefe des abzufahrenden Bereichs in y-Richtung eingegeben werden kann (in μm). Des weiteren kann die Anzahl der Hin- und Herbewegungen, mit denen der ausgewählte Bereich abgefahren werden soll, sowie die Geschwindigkeit für das Abfahren eingestellt werden. Nach Eingabe dieser Werte kann durch Anklicken einer START-Taste dieses Fensters das automatische Abfahren vom aktuellen Punkt ausgehend gestartet werden. Das automatische Abfahren kann jederzeit durch Betätigen einer beliebigen Taste unterbrochen werden.

[0053] Durch Anklicken eines in dem Fenster dargestellten CONTINUE-Buttons kann das automatische Abfahren von der zuletzt erreichten Position aus fortgeführt werden. Durch Anklicken eines QUIT-Buttons kann das automatische Abfahren beendet und das entsprechende Fenster geschlossen werden.

[0054] Der in Fig. 4 gezeigte Button 33 dient zur Korrektur einer infolge eines Objektivwechsels eintretenden Positionsverschiebung der optischen Abbildung. Bei einem Objektivwechsel kommt es aufgrund der nicht genau übereinstimmenden optischen Achsen der beiden Objektive zu einer Verschiebung des Zentrums der Bildschirmabbildung. Die Position des Trägartisches 3 bleibt erhalten, es verschiebt sich lediglich der Mittelpunkt der Bildschirmabbildung. Um diese Verschiebung der Bildschirmabbildung zu korrigieren, empfiehlt es sich, den Trägartisch 3 vor einem Objektivwechsel in eine vordefinierte Position zu fahren. Dies kann beispielsweise dadurch erreicht werden, dass die auf dem Bildschirm 8 dargestellte Laser-Markierung mit einem markanten Punkt des auf dem Träger befindlichen biologischen Materials zur Deckung gebracht wird. Anschließend kann das Objektiv gewechselt werden. Befindet sich danach die Laser-Markierung nicht über dem zuvor gewählten markanten Punkt des biologischen Materials, ist infolge des Objektivwechsels eine Positionsverschiebung der optischen Abbildung eingetreten. Wird nunmehr der Trägartisch 3 erneut in die zuvor gewählte vordefinierte Position gefahren, so dass sich die Laser-Markierung über dem gewählten markanten Punkt befindet, ist diese Verschiebung ein Maß für die infolge des Objektivwechsels eingetretene Positionsverschiebung der optischen Abbildung. Durch anschließendes Anklicken des Buttons 33 wird diese nach dem Objektivwechsel durchgeführte Verschiebung des Trägartisches 3 erfasst und alle zuvor gespeicherten Positionswerte bzw. die jeweils entsprechenden X- und Y-Koordinaten um die erfasste XY-Verschiebung korrigiert. Anschließend entsprechen alle gespeicherten Positionswerte bzw. Positionskordinaten des Trägartisches 3 wieder den gleichen charakteristischen Punkten.

[0055] Nach einem nachfolgend noch näher beschriebenen Katapultieren eines biologischen Objekts aus dem auf dem Träger befindlichen Material zu der an dem Manipulator 2 befindlichen Aufhangvorrichtung ("Cap"), ist es sinnvoll, durch Fokussieren auf das "Cap" zu begutachten, ob das herauskatapultierte biologische Objekt tatsächlich in dem "Cap" gefangen wurde. Um die Auffangvorrichtung bzw. das "Cap" mit dem Mikroskop betrachten zu können, muss der Trägartisch 3 so verschoben werden, dass sich einerseits das Mikroskop-Objektiv frei bewegen kann und andererseits das biologische Material nicht beschädigt wird. Durch Anklicken des Buttons 36 wird der Trägartisch 3 automatisch auf einen vorher definierten, als "Checkpoint" bezeichneten Punkt gefahren, der derart festgelegt worden ist, dass die zuvor beschriebenen Kriterien erfüllt sind und das "Cap" mit dem Mikroskop betrachtet werden kann.

[0056] Im folgenden wird das in Fig. 5 gezeigte Menüfenster 37, welches Steuerfunktionen zur automatischen Steuerung von Schneid- und/oder Katapultiervorgängen mittels Laserbestrahlung enthält, erläutert. Dieses Menüfenster 37 enthält unter anderem Funktionen zum Zeichnen von Kurvenverläufen sowie zum Messen von Distanzen im Bildschirmfenster. Ein mit Hilfe dieses Menüfensters 37 definierter Kurvenverlauf kann automatisch, d. h. rechnergestützt, in eine äquivalente Bewegung des Trägartisches 3 umgesetzt werden, so dass es möglich ist, den Trägartisch 3 derart relativ zu dem Laser zu verfahren, dass die tatsächliche Schnittlinie dem zuvor definierten Kurvenverlauf folgt. Die Geschwindigkeit und Anzahl der Wiederholungen des Schneidevorgangs lassen sich einstellen. Dasselbe gilt auch für das rechnergestützt durchgeführte Katapultieren, wobei auf analoge Art und Weise am Bildschirm zu katapultierende biologische Objekte ausgewählt und markiert werden können, die anschließend automatisch durch entsprechendes Verschieben des Trägartisches 3 über den Laser gefahren

und mit Hilfe eines automatisch oder manuell ausgelösten Laserschusses herauskatapultiert werden können.

[0057] Nach jedem Objektiv- oder Kamerawechsel sollte die Bewegung des Trägartisches 3 vor Verwendung der in dem Menüfenster 37 angebotenen Steuerfunktionen kalibriert werden. Durch dieses Kalibrieren wird die Bildschirm- und Trägartisch-ebene zur Deckung gebracht, d. h. es wird eine Übereinstimmung des auf dem Bildschirm dargestellten Videobilds mit der realen Trägartischposition hergestellt. Die Kalibrierung kann durch Anklicken des in Fig. 5 gezeigten Buttons 38 gestartet werden. Anschließend wird auf dem Bildschirm 8 ein Kreuz dargestellt. Der Benutzer muss nunmehr in den Verfahr-Modus wechseln und durch entsprechende Mausbewegung den Trägartisch 3 so verschieben, dass ein markanter Punkt des biologischen Materials unter dem dargestellten Kreuz zu liegen kommt. Anschließend muss der Benutzer wieder in den Cursor-Modus zurückkehren und beispielsweise durch Drücken der linken Maustaste das Anfahren des markanten Punktes bestätigen. Dieser Vorgang wird insgesamt viermal wiederholt, so dass insgesamt vier auf dem Bildschirm 8 dargestellte Kreuze mit dem jeweils gewählten markanten Bildpunkt zur Deckung gebracht werden. Diese vier mit dem gewählten markanten Bildpunkt zur Deckung zu bringenden Kreuze bilden die Eckpunkte eines auf der Spitze stehenden Quadrats. Die auf diese Weise gewonnenen Kalibrierungsinformationen werden gespeichert und bleiben auch nach Aus- und Einschalten des Systems erhalten. Bei jedem Wechsel des Objektivs am Mikroskop oder der Videokamera bzw. beim Umschalten auf eine andere Videokamera muss eine erneute Kalibrierung durchgeführt werden, wobei die Zeilen der jeweils aktiven Videokamera derart ausgerichtet sein müssen, dass sie mit den Bildschirmzeilen übereinstimmen. Ergänzend wird darauf hingewiesen, dass die zuvor bestimmte Kalibrierung im Prinzip auch dann durchgeführt werden kann, wenn lediglich zwei auf dem Bildschirm 8 dargestellten Kreuze mit einem markanten Bildpunkt zur Deckung gebracht werden. Durch das viermalige Anfahren dieses markanten Bildpunkts kann jedoch die Genauigkeit der Kalibrierung erhöht werden.

[0058] Wie bereits erwähnt worden ist, kann mit Hilfe des in Fig. 5 gezeigten Menüfensters 37 ein beliebiger Kurvenverlauf definiert werden, der anschließend als Grundlage für einen automatisch gesteuerten Schnitvorgang mit Hilfe der Laserbestrahlung dient. Durch Anklicken des Buttons 42 kann auf dem Bildschirm 8 eine kreisförmige Schnittlinie gezeichnet werden. Zu diesem Zweck muss nach Anklicken des Buttons 42 der auf dem Bildschirm 8 dargestellte Cursor mit Hilfe der Maus 10 auf den gewünschten Kreismittelpunkt gefahren und anschließend nach Drücken einer Maustaste der Cursor auf den gewünschten Kreisdurchmesser aufgezogen werden. Durch Betätigen der rechten Maustaste kann die Farbe der kreisförmigen Schnittlinie gewählt oder auch der gezeichnete Kreis gelöscht werden. Ebenso ist es möglich, die von einem gezeichneten Kreis umschlossene Fläche berechnen zu lassen, was ebenfalls über das nach Betätigen der rechten Maustaste angebotene Menü möglich ist. Nach erfolgter Berechnung wird der ermittelte Flächeninhalt in einem separaten Fenster angezeigt. Auf analoge Art und Weise kann durch Anklicken des Buttons 43 eine Freihandkurve auf dem Bildschirm 8 gezeichnet werden, die anschließend als Schnittkurve für ein automatisch durchgeführtes Schneiden des auf dem Träger befindlichen biologischen Materials verwendet wird. Dies soll nachfolgend näher anhand der Darstellungen in Fig. 8A-8C erläutert werden.

[0059] Fig. 8A zeigt die Bildschirmdarstellung bzw. das Videobild vor dem Zeichnen einer Schnittlinie. Im vorlie-

genden Fall handelt es sich beim dargestellten biologischen Material um eine Bakterienpopulation, die planar auf dem Träger aufgebracht ist. Durch Anklicken des Buttons 43 kann der Benutzer mit Hilfe einer entsprechenden Mausbewegung den Cursor auf dem Bildschirm 8 bewegen, so dass eine der Cursorbewegung folgende Freihandkurve 62 gezeichnet wird, die in Fig. 8B strichpunktiert dargestellt ist. Auch hinsichtlich einer bereits gezeichneten Freihandlinie kann diese durch Betätigen der rechten Maustaste wieder gelöscht oder die Farbe der auf dem Bildschirm 8 dargestellten Freihandkurve eingestellt werden. Zudem kann analog zu dem Fall einer kreisförmigen Kurve die von der Freihandkurve umschlossene Fläche berechnet und angezeigt werden. Durch Anklicken des in Fig. 5 gezeigten Buttons 44 kann eine Radiergummifunktion aktiviert werden, mit dessen Hilfe Teile der gezeichneten Freihandkurve 62 gelöscht werden können. Zu diesem Zweck ist insbesondere der Anfangspunkt für das Radieren und der Endpunkt für das Radieren anzuklicken, woraufhin der zu radierende Kurventeil markiert und nach Bestätigung durch den Benutzer gelöscht wird.

[0060] Anschließend kann durch Betätigen des Buttons 39 ein automatischer Schneidevorgang entlang der auf dem Bildschirm 8 gezeichneten Kurve 62 durchgeführt werden, d. h. der Computer 7 erzeugt automatisch Verstellsignale für den Trägereisch 3, so dass dieser entsprechend der gezeichneten Freihandkurve 62 über den Laserstrahl bewegt wird. In dem biologischen Material wird somit durch die Laserbestrahlung eine Schnittlinie 63 ausgebildet, die auch auf der Bildschirmarstellung sichtbar ist und ein zuvor durch die gezeichnete Freihandkurve 62 ausgewähltes biologisches Objekt 64 umgibt und dieses von dem umgebenden biologischen Material trennt. Die Geschwindigkeit, mit der dieser Laserschnitt durchgeführt wird, kann in einem Auswahlbereich 47 des Menüfensters 37 eingestellt werden. Durch Betätigen bzw. Anklicken des Buttons 40 kann der zuletzt durchgeführte Schneidevorgang wiederholt werden, d. h. der Trägereisch 3 wird automatisch nochmals entlang desselben Kurvenlaufs, verfahren. Des weiteren kann über den Einstellbereich 48 die Anzahl der Wiederholungen beim automatischen Schneiden festgelegt werden, so dass ein und derselbe Schneidevorgang automatisch mehrmals nacheinander durchgeführt wird.

[0061] Es ist zu beachten, dass vor dem automatischen Schneidevorgang die Laserleistung und/oder der Fokus des Laserstrahls in Abhängigkeit von der zu bearbeitenden Probe eingestellt werden muss. Dies kann, wie bereits zuvor erläutert worden ist, über das in Fig. 2 gezeigte Steuerpaneel erfolgen.

[0062] Das gemäß Fig. 8C ausgeschnittene biologische Objekt 64 kann nunmehr mit Hilfe einer weiteren Laserbestrahlung aus der biologischen Masse zu der an dem Manipulator 2 befindlichen Auffangvorrichtung katapultiert werden. Zu diesem Zweck sollte die in Fig. 9A durch ein schwarzes Dreieck dargestellte und auf dem Bildschirm 8 sichtbare Lasermarkierung 66 zu dem physikalischen Mittelpunkt des zu katapultierenden biologischen Objekts 64 bewegt werden. Anschließend sollte die Laserenergie gegenüber der zum Schneiden verwendeten Laserenergie erhöht und/oder der Laserstrahl gegenüber dem zum Schneiden verwendeten Laserstrahl defokussiert werden, um den angestrebten Photoneffekt zu erhalten, der zum Herausschleudern des gewünschten biologischen Objekts 64 führt. Ein einzelner Laserimpuls oder Laserschuss, der durch einen kurzen Druck auf den in Fig. 1 gezeigten Fußschalter 67 ausgelöst werden kann, führt anschließend zum Herauskatapultieren des gewünschten biologischen Objekts 64. Statt einer derartigen manuellen Aktivierung des Laserimpulses ist

auch eine von dem Computer 7 bzw. der darauf implementierten Steuerung durchgeführte automatische Aktivierung des Laserimpulses denkbar, wobei insbesondere auch die Laserenergie und/oder der Laserfokus automatisch entsprechend eingestellt werden kann.

[0063] Wie in Fig. 9B gezeigt ist, bleibt nach dem Herauskatapultieren des gewünschten biologischen Objekts 64 eine entsprechende Lücke 65 in dem auf dem Träger befindlichen biologischen Material zurück. Da das entsprechende biologische Objekt 64 zuvor aus der umgebenden biologischen Masse herausgeschnitten worden ist, weist das biologische Objekt 64 bzw. die Lücke 65 eine sehr saubere Schnittlinie auf.

[0064] Nur der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass selbstverständlich auch bereits separierte biologische Objekte 64 von dem Träger zu der an dem Manipulator 2 befindlichen Auffangvorrichtung (beispielsweise in Form eines Mikrozentrifugenbehälters) katapultiert werden können. Für die Mikrodisektion einzelner Zellen oder einzelner biologischer Objekte ist in der Regel eine geringere Schneide- und Katapultierenergie erforderlich.

[0065] Das Katapultieren ausgewählter biologischer Objekte 64 kann bei dem in Fig. 9A gezeigten System auch automatisch durchgeführt werden. Durch Anklicken des in Fig. 5 gezeigten Buttons 41 kann eine beliebige Anzahl von biologischen Objekten markiert werden, die anschließend automatisch katapultiert werden sollen. Zu diesem Zweck muss mit Hilfe der Computermaus 10 ein nach dem Anklicken des Buttons 41 auf dem Bildschirm 8 sichtbarer Marker auf das jeweils gewünschte biologische Objekt bewegt und die Auswahl dieses biologischen Objekts beispielsweise durch Betätigen der linken Maustaste bestätigt werden. Das auf diese Weise für den nachfolgenden automatischen Katapultierungsvorgang ausgewählte biologische Objekt erscheint anschließend entsprechend markiert in dem auf dem Bildschirm 8 dargestellten Videobild. Dieser Vorgang kann mehrmals wiederholt werden, so dass auf dem Bildschirm 8 eine entsprechende Anzahl von ausgewählten biologischen Objekten 66 markiert werden, wie es in Fig. 10A gezeigt ist. Im Statusfenster wird die Anzahl der markierten biologischen Objekte 66 angezeigt.

[0066] Für das Katapultieren der ausgewählten biologischen Objekte 66 ist es nicht unbedingt erforderlich, dass diese zuvor aus der umgebenden biologischen Masse herausgeschnitten worden sind. Vielmehr haben Untersuchungen ergeben, dass es grundsätzlich auch möglich ist, durch eine entsprechende Laserbestrahlung einzelne biologische Objekte direkt aus der umgebenden biologischen Masse herauszukatapultieren. Zum direkten Katapultieren einzelner biologischer Objekte muss die Laserenergie gegenüber einer zum Schneiden des entsprechenden biologischen Materials geeigneten Laserenergie um ca. 10–25%, vorzugsweise um 15–25%, erhöht werden. Ebenso sollte die Fokussierung des Laserstrahls gegenüber einem zum Schneiden geeigneten Laserstrahl entsprechend prozentual verschoben werden, wobei insbesondere gute Ergebnisse erzielt werden können, wenn der Brennpunkt des Lasers um ca. 1–2 µm gegenüber der Objektebene (insbesondere nach unten) verschoben wird. Durch die Erhöhung der Laserenergie und/oder durch die Defokussierung des Laserstrahls kann der gewünschte Photoneffekt erzielt werden, der das direkte Katapultieren von in einer biologischen Masse befindlichen biologischen Objekten ermöglicht.

[0067] Zum Katapultieren muss – wie zuvor beschrieben worden ist – die Laserenergie und/oder die Fokussierung des Laserstrahls entsprechend eingestellt werden. Dies kann sowohl manuell über das in Fig. 2 gezeigte Steuerpaneel als

auch automatisch erfolgen. Durch Anklicken des in Fig. 5 gezeigten Buttons 39 werden dann die zuvor auf dem Bildschirm markierten biologischen Objekte 66 nacheinander herauskatapultiert, wobei zu diesem Zweck jedes einzelne markierte biologische Objekt 66 durch automatische Erzeugung entsprechender Verstellsignale für den Trägertisch 3 über den Laser gefahren und anschließend bei maximal eingestellter Pulsrate der Laser für einen bis zwei Laserimpulse aktiviert wird. Nachdem auf diese Weise eines der markierten biologischen Objekte 66 herauskatapultiert worden ist, wird automatisch das nächste markierte biologische Objekt 66 angefahren und der Katapultvorgang wiederholt. In Fig. 10B ist die Darstellung des Bildschirms 8 nach Herauskatapultieren sämtlicher zuvor markierter biologischer Objekte 66 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass in dem biologischen Material entsprechende Lücken 65 zurückbleiben. Diese Lücken 65 weisen eine unebene oder aufgeraute Schnittlinie auf, was darauf zurückgeht, dass die entsprechenden biologischen Objekte 66 nicht zuvor aus der umgebenden biologischen Masse herausgeschnitten, sondern direkt aus dieser herauskatapultiert worden sind.

[0068] Durch Anklicken des in Fig. 5 gezeigten Buttons 40 kann analog zum automatischen Schneidevorgang der zuvor durchgeführte Katapultvorgang wiederholt werden, so dass für alle zuvor markierten biologischen Objekte 66 (vergleiche Fig. 10A) ein erneuter Katapultvorgang ausgelöst wird. Dies ist insbesondere dann sinnvoll, wenn einzelne der zuvor markierten biologischen Objekte 66 beim ersten Versuch nicht vollständig aus der umgebenden biologischen Masse herauskatapultiert werden konnten.

[0069] Wie bereits zuvor erläutert worden ist, sollte zum Katapultieren der Laserstrahl stets auf den physikalischen Mittelpunkt des gewünschten biologischen Objekts bewegt werden. Statt dessen ist jedoch auch möglich, beim Ausschneiden des entsprechenden biologischen Objekts eine ca. 1-2 µm dünne Verbindung zwischen dem gewünschten biologischen Objekt und der umgebenden biologischen Masse zu lassen und anschließend zum Katapultieren den Laser exakt über diese dünne Verbindung zu fahren, wobei der anschließende Katapultvorgang insbesondere auch ohne Defokussierung des Laserstrahls durchgeführt werden kann. Diese Vorgehensweise besitzt den Vorteil, dass vor dem Katapultvorgang ein ungewollter Herausfallen oder Verschieben des zuvor ausgeschnittenen biologischen Objekts vermieden werden kann.

[0070] Eine besondere Funktion stellt der in Fig. 5 gezeigte Button 45 dar. Durch Anklicken dieses Buttons kann eine Distanzmessung eingeschaltet werden. Wird anschließend beispielsweise durch Betätigen der linken Maustaste ein Anfangspunkt auf dem dargestellten Videobild ausgewählt und der Cursor bei weiterhin gedrückter linker Maustaste zu einem gewünschten Endpunkt bewegt, wird nach Loslassen der entsprechenden Maustaste automatisch die Distanz zwischen dem gewählten Anfangspunkt und dem gewählten Endpunkt ermittelt und auf dem Bildschirm 8 dargestellt. Durch erneutes Anklicken des Buttons 45 kann die Distanzmessungsfunktion wieder ausgeschaltet werden.

[0071] Der ebenfalls in Fig. 5 gezeigte Button 46 hat das Löschen sämtlicher Markierungen auf dem Bildschirm 8 zur Folge. D. h. nach Anklicken des Buttons 46 werden alle auf dem Bildschirm 8 gezeichneten Schnittkurven und alle zum Katapultieren markierten Punkte gelöscht.

[0072] Des weiteren ist in Fig. 5 ein Anzeigenbereich 49 dargestellt, wobei in diesem Anzeigenbereich 49 stets die laufende Nummer des aktuell angefahrenen Punktes bei einer zum Katapultieren zuvor markierten Punkteschar dargestellt wird.

[0073] Da die zum Schneiden bzw. Katapultieren benö-

tigte Energie u. a. auch von der Beschaffenheit des jeweils verwendeten Objektivs 18 abhängt, ist es besonders vorteilhaft, wenn für verschiedene Objektive entsprechende Energieeinstellungen und/oder Fokuseinstellungen des Laserstrahls abgespeichert werden können. Diese Einstellwerte können dabei vorzugsweise in Bezug auf entsprechende Bearbeitungsposition abgespeichert werden, so daß bei Verwendung eines bestimmten Objektivs die gewünschten Bearbeitungsbereiche oder Bearbeitungspunkte automatisch angefahren und die jeweils zum Schneiden oder Katapultieren geeignete Bestrahlungsenergie und/oder Fokussierung automatisch eingestellt werden.

[0074] Nachfolgend sollen kurz die Steuerfunktionen des zur Steuerung des Manipulators 2 vorgesehenen Menüfensters erläutert werden, welches durch Anklicken des in Fig. 3 gezeigten Buttons 22 aufgerufen bzw. geöffnet werden kann. Das entsprechende Menüfenster 50 ist in Fig. 6 dargestellt.

[0075] Durch Anklicken des in Fig. 6 gezeigten Buttons 51 kann der Manipulator 2 in eine zuvor definierte und abgespeicherte Home-Position gefahren werden. Diese Home-Position entspricht einer Position des Manipulators 2, bei der sich der Manipulator 2 außerhalb des Sichtfeldes befindet und bestückt werden kann. Entsprechend kann durch Anklicken des Buttons 52 der Manipulator 2 in die sogenannte Target-Position gefahren werden, welche der eigentlichen Arbeitsposition des Manipulators 2 entspricht und insbesondere zum Aufsammeln von herauskatapultierten biologischen Objekten verwendet wird. In dieser Target-Position befindet sich der Manipulator 2 bzw. die daran befestigte Auffangvorrichtung im Sichtfeld über dem Träger des biologischen Materials. Über dem unter den Buttons 51 und 52 befindlichen Einstellbereich 53 kann analog zu dem in Fig. 4 gezeigten Menüfenster 23 die Geschwindigkeit der automatischen Manipulatorbewegung in drei Geschwindigkeitsstufen grob eingestellt werden. Mit Hilfe des darunter befindlichen Schiebers 54 kann zusätzliche eine Feineinstellung der Anfahrsgeschwindigkeit von 1-100% vorgenommen werden. Der Zahlenwert unterhalb des Schiebers 54 zeigt den jeweils aktuell eingestellten Prozentsatz an.

[0076] Die in den Fig. 4-6 gezeigten und zuvor erläuterten Menüfenster 23, 37 bzw. 50 fassen die wichtigsten Steuerfunktionen des in Fig. 1 gezeigten Systems zusammen und dienen dazu, dass auch ein unerfahrener Anwender möglichst rasch auf diese Steuerfunktionen zugreifen kann. Neben diesen Menüfenstern wird am oberen Bildschirmrand ständig eine Menüleiste angeboten, welche mehrere nebeneinander angeordnete Menüpunkte aufweist, bei deren Anklicken Untermenüs (sogenannte "Pull-Down-Menüs") geöffnet werden, um weitere Einstellungen vorzunehmen. Alle Steuerfunktionen der in Fig. 4-6 gezeigten Menüfenster sind auch in diesen "Pull-Down-Menüs" enthalten.

[0077] So enthält diese Menüleiste beispielsweise einen Menüpunkt "File", bei dessen Anklicken Informationen über die aktuelle Programmversion aufgerufen, das aktuelle Video- bzw. Kamerabild auf einem ausgewählten Speichermedium gespeichert oder das Steuerprogramm beendet werden kann. Des weiteren weist die Menüleiste einen Menüpunkt "Optik" auf, der Funktionen zur Konfiguration der Bildschirmwiedergabe des Kamerabilds enthält. Unter diesem Menüpunkt kann beispielsweise die Wiedergabe der drei Grundfarben Rot, Grün und Blau sowie der Kontrast und die Helligkeit der Bildschirmdarstellung verändert werden, wobei die unter diesem Menüpunkt vorgenommenen Einstellungen auch Einfluss auf die als Datei gespeicherte Kamerabilder haben.

[0078] Ein weiterer Menüpunkt "Stage" der am oberen Bildschirmrand dargestellten Menüleiste umfasst einige

Funktionen der in Fig. 4 und Fig. 5 gezeigten Menüfenster. Zudem kann unter diesem Menüpunkt die automatische Bewegung des Trägers 3 derart konfiguriert werden, dass die Bewegung auf eine wählbare Koordinatenachse beschränkt bleibt oder eine horizontale Mausebewegung in eine seitenverkehrte horizontale Bewegung des Trägers 3 umgesetzt wird. Für das automatische Schneiden können die entsprechenden Steuerparameter (Radius der Kreisbewegung in μm , Anzahl der Wiederholungen, Schnittgeschwindigkeit etc.) eingestellt werden. Darüber hinaus kann unter diesem Menüpunkt auch das Rechteck konfiguriert werden, welches für ein mäanderförmiges Abfahren der auf dem Träger befindlichen biologischen Masse verwendet wird (vergleiche den in Fig. 4 gezeigten Button 32). Zusätzlich kann unter diesem Menüpunkt eine bestimmte Verfahrensposition des Trägers 3 als Referenzposition für alle gespeicherten Positionswerte definiert werden. Sollte zu einem späteren Zeitpunkt dieselbe biologische Probe wiederverwendet werden, lässt sich somit der Bezug zu früher gespeicherten Koordinaten wiederherstellen. Damit die Referenzposition auf der biologischen Probe wiedergefunden werden kann, sollte sie dauerhaft gekennzeichnet sein (beispielsweise durch eine entsprechende Lasermarkierung).

[0079] Ein weiterer Menüpunkt "Manipulator" der am oberen Bildschirmrand dargestellten Menüleiste betrifft die Steuerung des Manipulators 2 und umfasst sämtliche der in Fig. 6 gezeigten Steuerfunktionen. Zudem kann unter diesem Menüpunkt die aktuelle Manipulatorfunktion als Target-Position oder Home-Position gespeichert werden (vergleiche die in Fig. 6 gezeigten Buttons 51 und 52, mit denen diese Positionen automatisch wiederangefahren werden können). Des weiteren kann unter diesem Menüpunkt festgelegt werden, in welcher Reihenfolge die drei Koordinatenachsen bei der Bewegung des Manipulators 2 von und zur Home-Position abgefahren werden sollen. Durch eine geeignete Wahl dieser Einstellung kann der Manipulator 2 veranlasst werden, Hindernisse zu umfahren, so dass verhindert werden kann, dass der Manipulator 2 die daran befestigte Auffangvorrichtung oder die auf dem Träger befindliche biologische Probe durch eine Bewegung des Manipulators beschädigt wird. Um eine Beschädigung der Probe zu verhindern, sollte die z-Richtung beim Herausfahren des Manipulators 2 als erste und beim Hereinfahren des Manipulators 2 als letzte gefahren werden. Zudem kann unter diesem Menüpunkt auch die Zuordnung zwischen der Mausebewegung und der Manipulatorbewegung hinsichtlich der X-, Y- und Z-Koordinate umgekehrt werden.

[0080] Die Menüleiste weist des weiteren einen "Lasermarker"-Menüpunkt auf, über den die Bildschirmdarstellung des Lasermarkers konfiguriert werden kann. Der Lasermarker zeigt denjenigen Ort an, an dem der Laserstrahl bei Auslösung auf die auf dem Träger befindliche Probe trifft. Durch Anklicken dieses Menüpunkts kann beispielsweise das in Fig. 7 gezeigte Konfigurationsfenster 55 geöffnet werden. Mit Hilfe des Auswahlbereichs 56 kann das zur Darstellung des Laserauftreffpunktes gewählte Symbol, mit dem der Laser auf dem Bildschirm 8 dargestellt wird, ausgewählt werden. Beim dargestellten Beispiel ist als Lasermarkierung ein Fadenkreuz ausgewählt. Ist das Kästchen 57 aktiviert, wird die Darstellung des Lasermarkers auf dem Bildschirm 8 nach Anklicken des Buttons 60 gelöscht. Durch Aktivierung des Kästchens 58 kann nach anschließendem Anklicken des Buttons 60 der Lasermarker mit der Maus verschoben werden. Es erscheint dann ein durch Bewegung der Maus verschiebbares Positionierungskreuz, wobei beispielsweise durch Drücken der linken Maustaste die aktuelle Position dieses Positionierungskreuzes als neue Lasermarkerposition übernommen werden kann. Durch Anklicken

des Buttons 59 kann ein Fenster zur Auswahl der Darstellungsfarbe des Lasermarkers geöffnet werden. Durch Anklicken des Buttons 61 können schließlich alle vorgenommenen Änderungen verworfen und die im Speicher befindliche Position des Lasermarkers geladen werden. Anschließend wird das Fenster 55 geschlossen.

[0081] Die Menüleiste weist schließlich auch einen Menüpunkt "Cut" auf, in dem sämtliche Steuerfunktionen des in Fig. 5 gezeigten Menüfensters 37 zusammengefasst sind, die insbesondere zum automatischen Schneiden und/oder Katapultieren dienen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung eines biologischen Objekts aus einer biologischen Masse, wobei sich die biologische Masse auf einem Träger (3) befindet, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein bestimmtes biologisches Objekt (64) der biologischen Masse durch ein und dieselbe Bestrahlung eines biologischen Objekts (64) mit einem Laserstrahl aus der biologischen Masse herausgelöst und von dem Träger (3) zu einer Auffangvorrichtung (2) katapultiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestrahlung des biologischen Objekts (64) zum Katapultieren desselben von dem Träger (3) zu der Auffangvorrichtung (2) in Form eines Laserschusses erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass zum Katapultieren des biologischen Objekts (64) von dem Träger (3) zu der Auffangvorrichtung (2) das biologische Objekt (64) mit einem Laserstrahl bestrahlt wird, dessen Laserenergie im Vergleich zu der zum Schneiden der biologischen Masse benötigten Laserenergie erhöht wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Laserenergie des Laserstrahls zum Katapultieren des biologischen Objekts (64) von dem Träger (3) zu der Auffangvorrichtung (2) im Vergleich zu der zum Schneiden der biologischen Masse benötigten Laserenergie um ca. 10–25% erhöht wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Laserenergie des Laserstrahls zum Katapultieren des biologischen Objekts (64) von dem Träger (3) zu der Auffangvorrichtung (2) im Vergleich zu der zum Schneiden der biologischen Masse benötigten Laserenergie um ca. 15–25% erhöht wird.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zum Katapultieren des biologischen Objekts (64) von dem Träger (3) zu der Auffangvorrichtung (2) das biologische Objekt mit einem Laserstrahl bestrahlt wird, der im Vergleich zu einer zum Schneiden der biologischen Masse durchgeführten Laserbestrahlung in Bezug auf die Ebene der biologischen Masse defokussiert wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass zum Katapultieren des biologischen Objekts (64) von dem Träger (3) zu der Auffangvorrichtung (2) der Brennpunkt des Laserstrahls im Vergleich zu einem zum Schneiden der biologischen Masse geeigneten Laserstrahl um ca. 1–2 μm gegenüber der Ebene der biologischen Masse verstellt wird.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestrahlung des zu katapultierenden biologischen Objekts (64) mit dem Laserstrahl und damit das Katapultieren des biologischen Objekts (64) von dem Träger (3) zu der Auffangvorrichtung (2) rechnergestützt erfolgt.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein zu katapultierendes biologisches Objekt (64) ausgewählt und die Position des ausgewählten biologischen Objekts (64) innerhalb der umgebenden biologischen Masse gespeichert wird, dass anschließend die biologische Masse entsprechend der gespeicherten Position des biologischen Objekts gegenüber dem Laserstrahl rechnergestützt ausgerichtet und mit dem Laserstrahl bestrahlt wird, um das biologische Objekt (64) von dem Träger (3) zu der Auffangvorrichtung (2) zu katapultieren.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere zu katapultierende biologische Objekte (64) ausgewählt und die einzelnen Positionen (66) der ausgewählten biologischen Objekte (64) innerhalb der biologischen Masse gespeichert werden, und dass die biologische Masse rechnergestützt entsprechend der einzelnen gespeicherten Positionen gegenüber dem Laserstrahl ausgerichtet und mit dem Laserstrahl bestrahlt wird, um die an den gespeicherten Positionen befindlichen biologischen Objekte (64) nacheinander von dem Träger (3) zu der Auffangvorrichtung (2) zu katapultieren.
11. Vorrichtung zur Gewinnung eines biologischen Objekts aus einer biologischen Masse, mit einem Träger (3) zur Aufnahme der biologischen Masse, mit einer Laserlichtquelle (4) zur Erzeugung eines Laserstrahls, mit dem die biologische Masse zu bestrahlen ist, und mit einer Auffangvorrichtung (2) zum Auffangen eines aus der biologischen Masse herauskatapultierten biologischen Objekts (64), dadurch gekennzeichnet, dass Einstellmittel (7, 11, 12) vorgesehen sind, um den von der Laserlichtquelle (4) erzeugten Laserstrahl derart einzustellen, dass bei Bestrahlung eines bestimmten biologischen Objekts (64) der biologischen Masse mit dem Laserstrahl dieses biologische Objekt (64) infolge dieser einen Bestrahlung sowohl aus der biologischen Masse herausgelöst als auch von dem Träger (3) zu der Auffangvorrichtung (2) katapultiert wird.
12. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1-10 ausgestaltet ist.
13. Vorrichtung nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Einstellmittel Mittel zum Aktivieren der Laserlichtquelle (4) zur Erzeugung eines Laserstrahls in Form eines Laserschusses umfassen, um das gewünschte biologische Objekt (64) von dem Träger (3) zu der Auffangvorrichtung (2) zu katapultieren.
14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11-13, dadurch gekennzeichnet, dass die Einstellmittel Mittel zur Einstellung der Laserenergie des von der Laserlichtquelle (4) erzeugten Laserstrahls umfassen.
15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11-14, dadurch gekennzeichnet, dass die Einstellmittel Mittel (11) zur Verstellung der Fokussierung des Laserstrahls in Bezug auf die Ebene der auf dem Träger (3) befindlichen biologischen Masse umfassen.
16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13-15, dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel zur Aktivierung der Laserlichtquelle (4) die Mittel (12) zur Einstellung der Laserenergie und/oder die Mittel (11) zur Fokussie-

- rung des Laserstrahls rechnergestützt angesteuert sind.
17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11-16, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung von einem Computersystem (7) gesteuert ist, dass das Computersystem (7) Auswahlmittel zur Auswahl mindestens eines aus der biologischen Masse herauszukatapultierenden biologischen Objekts (64) umfasst, dass das Computersystem (7) Steuermittel zur automatischen Ansteuerung der Laserlichtquelle (4) umfasst, um das ausgewählte biologische Objekt (64) mit dem Laserstrahl zu bestrahlen und somit von dem Träger (3) zu der Auffangvorrichtung (2) zu katapultieren.
18. Vorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Computersystem (7) Speichermittel zum Speichern der Positionen (66) von mehreren über die Auswahlmittel ausgewählten biologischen Objekten (64), die aus der biologischen Masse herauskatapultiert werden sollen, umfasst, und dass die Steuermittel des Computersystems (7) derart ausgestaltet sind, dass sie entsprechend den gespeicherten Positionen der ausgewählten biologischen Objekte (64) Verstellmittel zur Herbeiführung einer entsprechenden Relativbewegung zwischen dem Träger (3) und dem Laserstrahl ansteuern, um die den ausgewählten biologischen Objekten (64) entsprechenden Positionen (66) der auf dem Träger (3) befindlichen biologischen Masse gegenüber dem Laserstrahl auszurichten und anschließend durch automatische Aktivierung der Laserlichtquelle (4) das jeweils gegenüber dem Laserstrahl ausgerichtete biologische Objekt (64) von dem Träger (3) zu der Auffangvorrichtung (2) zu katapultieren.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

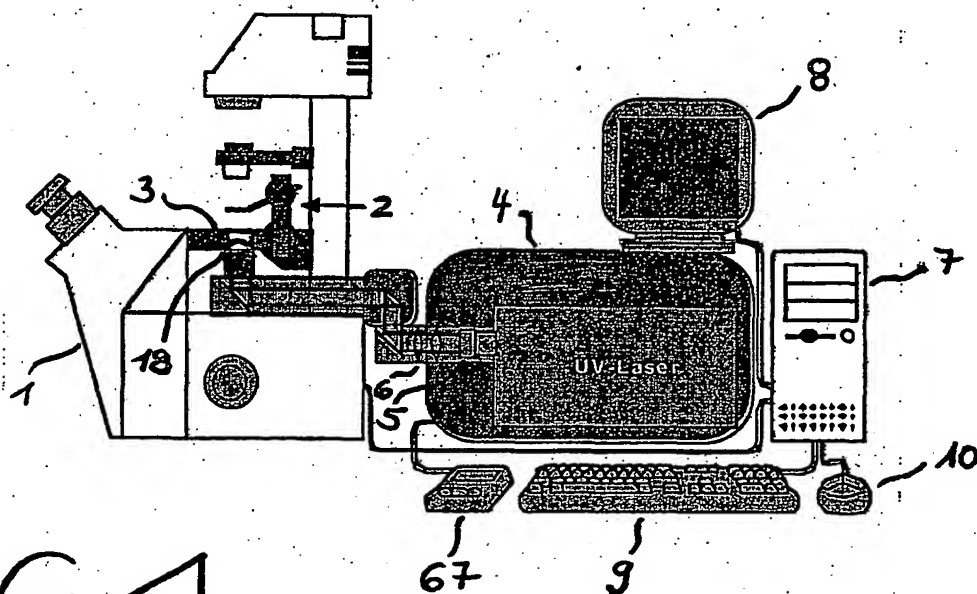


FIG 1

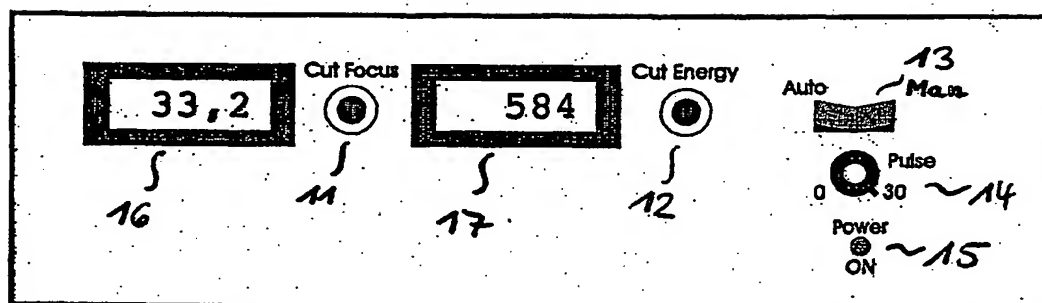


FIG. 2

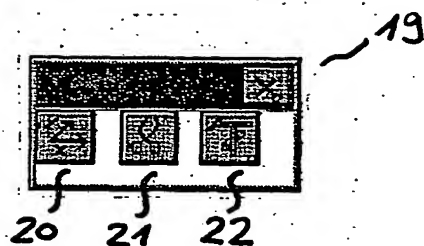


FIG. 3

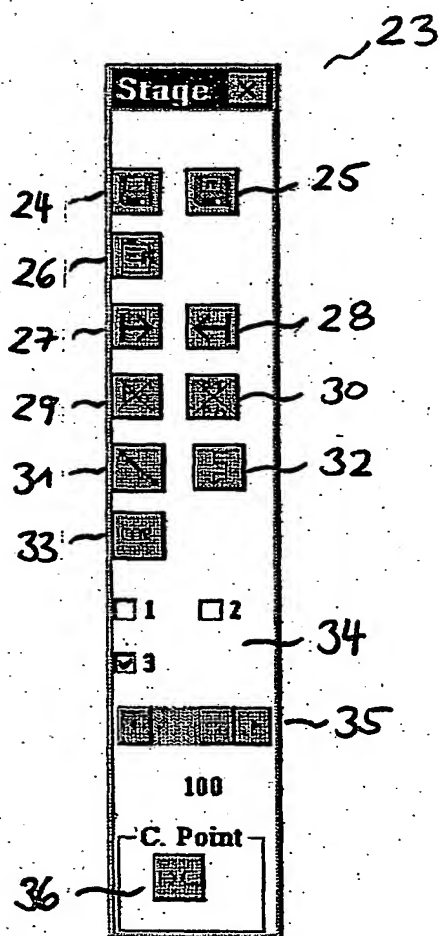


FIG. 4

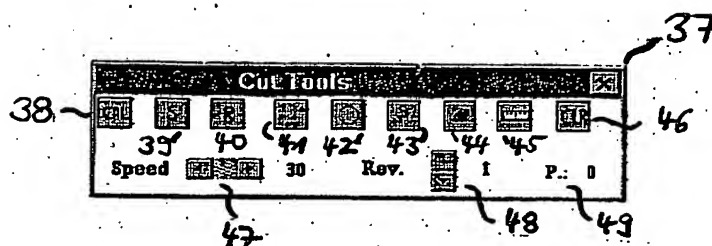


FIG. 5

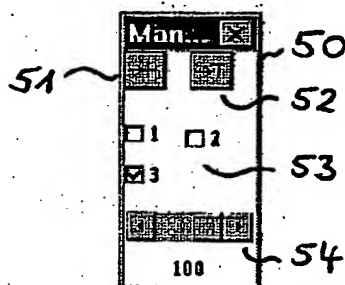


FIG. 6

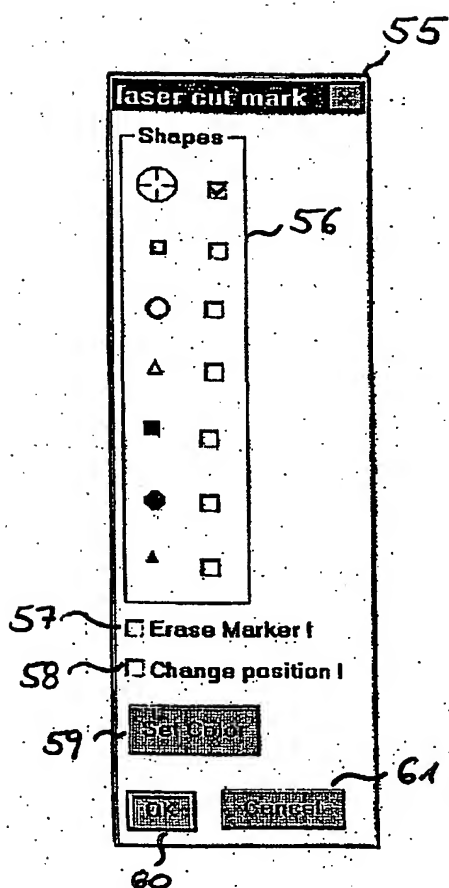


FIG. 7

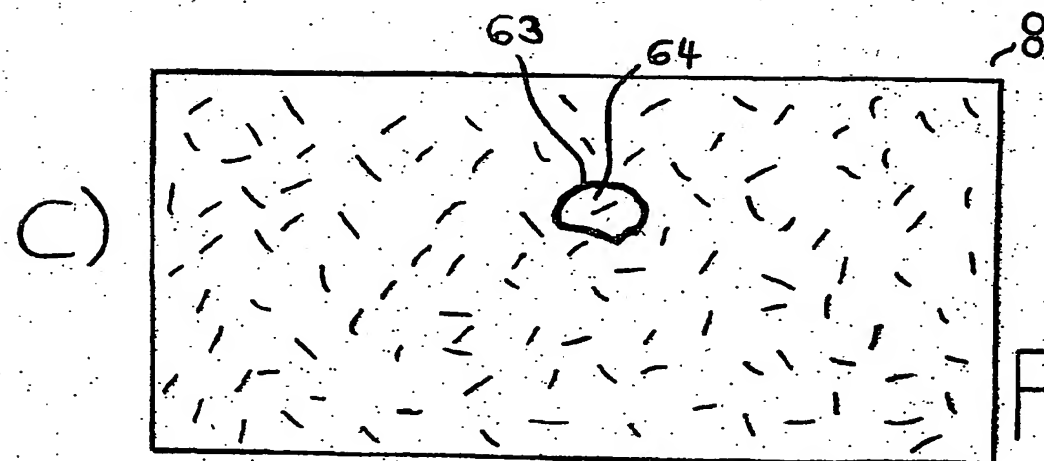
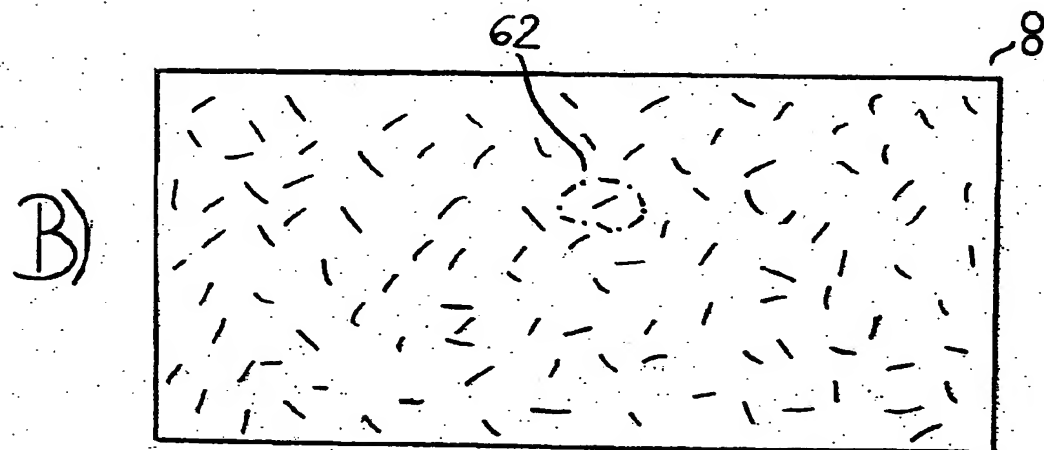


FIG 8

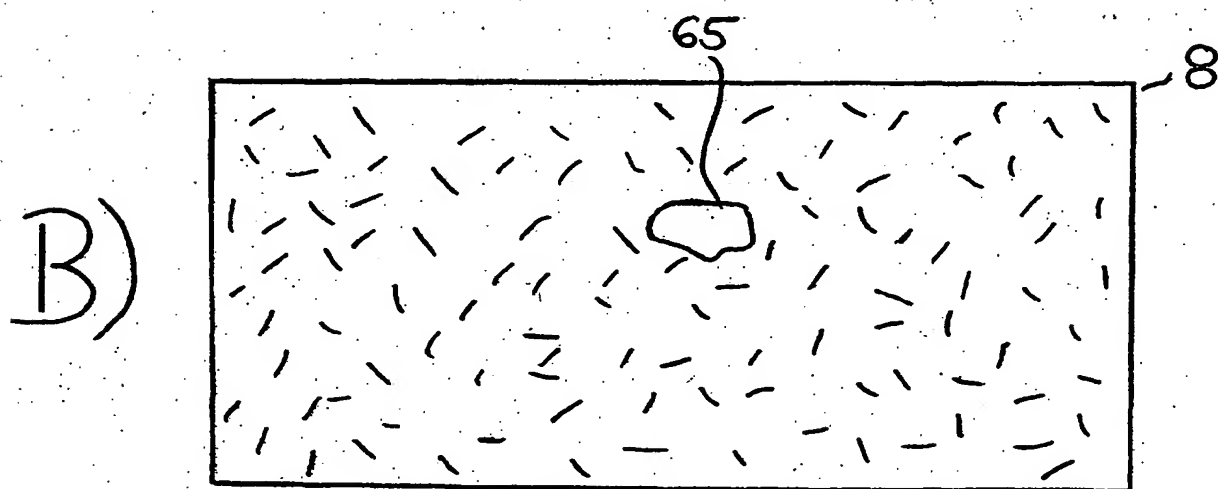
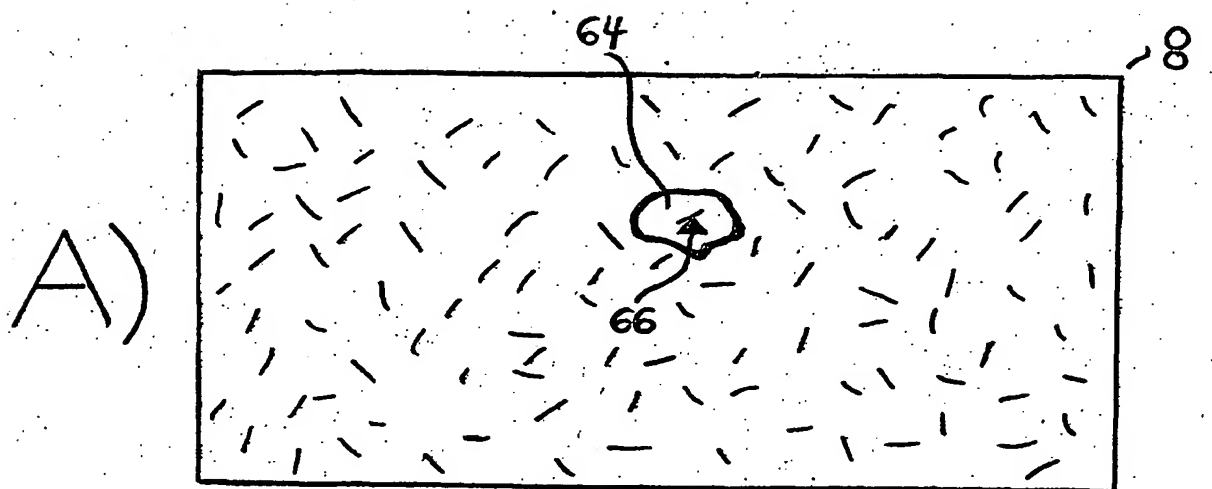


FIG. 9

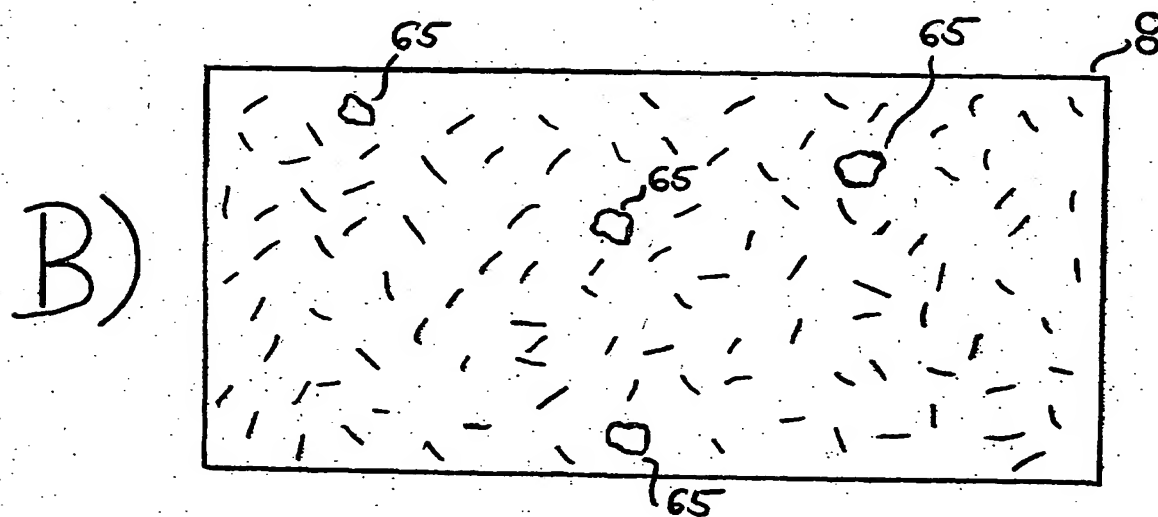
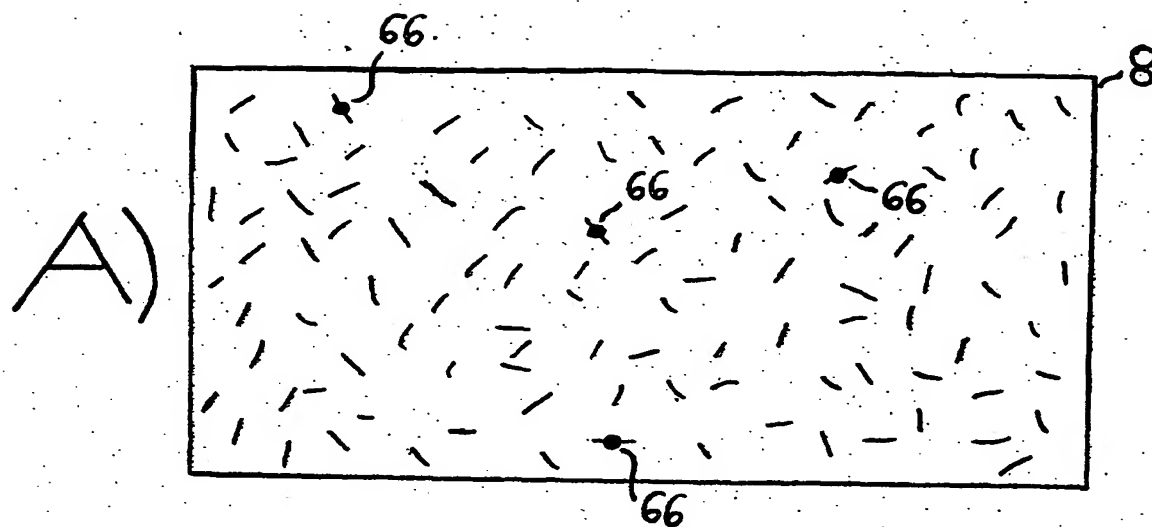


FIG. 10